

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19300163
研究課題名（和文） 微小循環モックシステムによる糖尿病性及び虚血性血流障害と細胞間相互作用の検討
研究課題名（英文） Study on cellular interactions of blood cells and endothelial cells under diabetic and ischemia/reperfusion dysfunctions using microcirculatory mock system
研究代表者 南谷 晴之 (MINAMITANI HARUYUKI) 慶應義塾大学・理工学部・教授 研究者番号：70051779

## 研究成果の概要：

微小循環を模擬した圧流量制御可変なマイクロ流体デバイスを作製し、デバイス内に内皮細胞を安定化培養した状態で、生体の血圧（貫壁性圧力）と剪断応力を付加できるモックシステムを構築した。これを用いて高血糖および高血圧下の内皮細胞と血球細胞の相互作用について細胞接着促進因子や走化性因子の発現と分子生理機能を探究した。フローデバイス内の流れは灌流速度  $2\sim 30\text{ mm s}^{-1}$ 、shear rate  $100\sim 1500\text{ s}^{-1}$  に制御することが可能であり、定常流と拍動流の双方が模擬できる。また、大動脈（ $100\pm 20\text{ mmHg}$ ,  $15\pm 5\text{ dynes/cm}^2$ ）、細動脈（ $35\pm 10\text{ mmHg}$ ,  $20\pm 3\text{ dynes/cm}^2$ ）、細静脈（ $10\pm 5\text{ mmHg}$ ,  $3\pm 1\text{ dynes/cm}^2$ ）、高血圧（ $120+100\text{ mmHg}$ ,  $25+10\text{ dynes/cm}^2$ ）レベルの圧力と剪断応力を内皮細胞に負荷することが可能である。ヒト臍帯静脈内皮細胞とヒト大動脈内皮細胞の形態変化、細胞接着促進因子や走化性因子の定量分析を蛍光イメージング法や RT-PCR 法などを用いて行い、病態に関わる特異性を明らかにした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
年度			
総計	4,400,000	1,320,000	5,720,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：フィジオーム、微小循環、モックシステム、糖尿病、内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

加齢や生活習慣の変化に伴い糖尿病や代謝異常に基づく血管病変の増加が問題となっているが、このような病態では動脈硬化、壊疽脱疽、失明、神経損傷、脳梗塞や心筋梗塞、腎不全など重篤な合併症へと進行する場合が多い。その過程において易血栓性の進行が著しく、血管内皮細胞と血小板および白血

球との相互作用に基づく病態増悪作用も問題になっている。また虚血再灌流障害では、微小循環レベルの血栓塞栓と再灌流後の二次的血栓形成に伴う浮腫や出血などの病態が問題となるが、これには虚血後の白血球の炎症反応が中心的役割をなし、白血球のみならず血小板の活性化に伴う活性酸素産生やタンパク分解酵素の放出で組織傷害をきた

すほか、血管透過性の亢進、白血球・血小板の血管壁接着・粘着亢進、微小循環レオロジーの変化などが起こり、微小循環障害を増悪させる。これらの現象は糖尿病において亢進すると考えられるが、血小板が炎症反応に直接的に関与するという細胞分子レベルの機能解明には未だ至っていない。また、白血球と血小板の活性化や活性酸素産生に伴って内皮細胞の機能変化、形態変化、細胞接着因子の発現亢進がどの程度あり、細胞間相互作用がいかになされるかについても不明な点が多い。これらが生体にどのような意味を持つのかを解析することは、炎症反応を理解し、微小循環レベルでの血流障害の病態を把握する上で重要かつ意義深い。

## 2. 研究の目的

本研究では、微小循環を模擬した圧流量制御可変なマイクロ流体デバイス *in-vitro* 系モデルを作製し、フローデバイス内に内皮細胞を安定化培養した状態で、生体と同様な血圧と血流量、シェアストレスを付加できる微小循環モックシステムを構築する。これを用いて高血糖下および高血圧下の微小循環障害さらに虚血再灌流障害（低酸素下）における内皮細胞と白血球・血小板の相互作用を細胞・分子生理機能の観点から探究することを目的としている。

## 3. 研究の方法

微小循環および血管内皮層を模擬した圧・流量制御可変な拍動型マイクロ流体デバイス *in-vitro* モデル（図1）を作製し、フローデバイス内に内皮細胞を安定化培養した状態で、生体と同様な血圧と血流量、シェアストレスを付加できる微小循環モックシステムを使用した。流体デバイス内の流れは灌流速度  $2\sim 30\text{ mm s}^{-1}$ 、shear rate  $100\sim 1500\text{ s}^{-1}$  に制御され、定常流と拍動流の双方が模擬でき、正常な大動脈、細動脈、細静脈レベル、及び高血圧レベルの圧力と剪断応力を内皮細胞に負荷することが可能である。

対象はヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞（HUVECs）あるいはヒト臍帯動脈由来血管内皮細胞（HAECs）であり、正常培養（D-glucose 5mM）に対して高血糖培養（D-glucose 30mM）では灌流液も高血糖付加して糖尿病モデルとした。

血圧と shear stress 負荷に対し、内皮細胞の形態変化、骨格分子 F アクチン、細胞間接着分子 ZO-1、VE カドヘリンの変化、接着分子 P-selectin、E-selectin、ICAM-1、VCAM-1、走化性因子 MCP-1 の変化を蛍光イメージング、マイクロプレートリーダーおよびリアルタイム PCR を用いて解析した。

虚血再灌流障害モデルとして、灌流液（ハ

ンクス磷酸緩衝液 + 培養液）に  $5\% \text{CO}_2$  と  $95\% \text{N}_2$  ガスのバブリングを行い、継続的に低酸素状態を実現し、1時間虚血（低酸素化）し、4時間後に再灌流する虚血再灌流法を行い、上記諸因子発現の解析と、血管内皮・白血球・血小板の相互作用、血管透過性の亢進に伴う細胞の凝集・接着能を観測した。以上の実験に加えて細胞間相互作用の薬理効果を検討した。

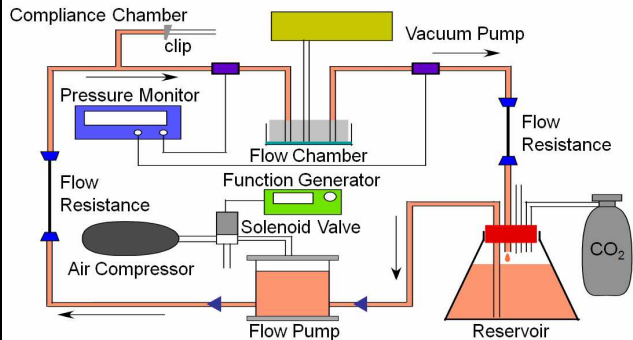


図1 マイクロ流体デバイスのブロック図

## 4. 研究成果

微小循環を模擬した圧流量制御可変なマイクロ流体デバイスを作製し、デバイス内に内皮細胞を安定化培養した状態で、生体の血圧（貫壁性圧力）と剪断応力を付加できるモックシステムを構築した。これを用いて高血糖および高血圧下の内皮細胞と血球細胞の相互作用を分子生理機能の観点から探究することを目的として研究を行った。フローデバイス内の流れは灌流速度  $2\sim 30\text{ mm s}^{-1}$ 、shear rate  $100\sim 1500\text{ s}^{-1}$  に制御することが可能であり、定常流と拍動流の双方が模擬できる。また、大動脈（ $100\pm 20\text{ mmHg}$ ,  $15\pm 5\text{ dynes/cm}^2$ ）、細動脈（ $35\pm 10\text{ mmHg}$ ,  $20\pm 3\text{ dynes/cm}^2$ ）、細静脈（ $10\pm 5\text{ mmHg}$ ,  $3\pm 1\text{ dynes/cm}^2$ ）、高血圧（ $120\pm 100\text{ mmHg}$ ,  $25\pm 10\text{ dynes/cm}^2$ ）レベルの圧力と剪断応力を内皮細胞に負荷することが可能となった。

流体デバイス内に生理的血流状態に即してヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs）あるいはヒト大動脈内皮細胞（HAECs）を confluent な状態に培養し、それらの形態変化、細胞接着促進因子や走化性因子の定量分析を蛍光イメージング法、マイクロプレートリーダーやリアルタイム PCR 法などを用いて行った。上記メカニカルストレスに対する内皮細胞の配向性や細胞骨格分子 F アクチンと細胞間接着分子 VE カドヘリンの変化を検討した結果、定常流より拍動流の方が血管内皮のリモデリングを促進することが明らかとなり（図2）（図3）本システムの有効性が示された。

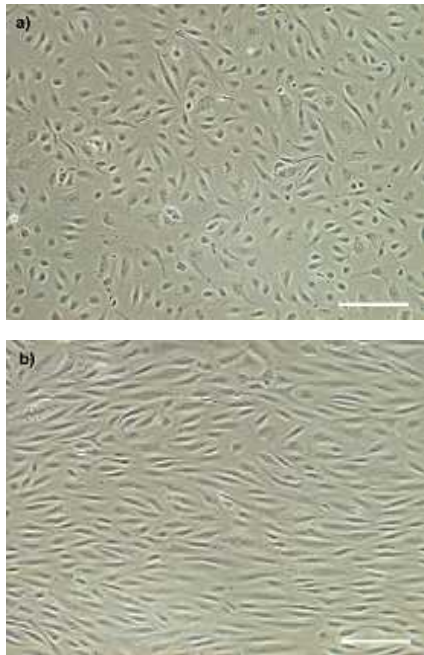


図2 拍動流負荷による血管内皮細胞の形態変化(上段:拍動流負荷前、後段:拍動流負荷24時間後のリモデリング。スケールバーは200  $\mu$ m)

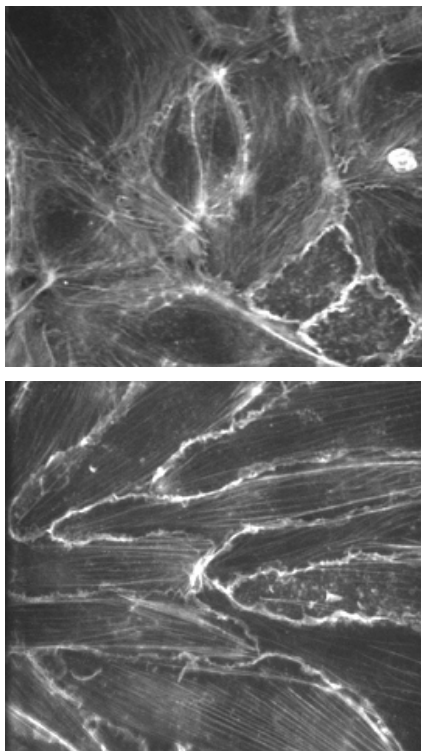


図3 拍動流負荷による血管内皮細胞のF-アクチン変化(上段:拍動流負荷前、後段:拍動流負荷24時間後)

正常状態の拍動流負荷では内皮細胞に発現する細胞接着因子 ICAM-1 の mRNA は定

常流負荷より有意に抑制され、VCAM-1 および E-selectin の mRNA は僅かに減少し、細胞走化性因子 MCP-1 の mRNA は有意に増加し、拍動流が内皮細胞の機能を修飾することが示された(図4)。P-selectin に関しては有意な変化はみられなかった。

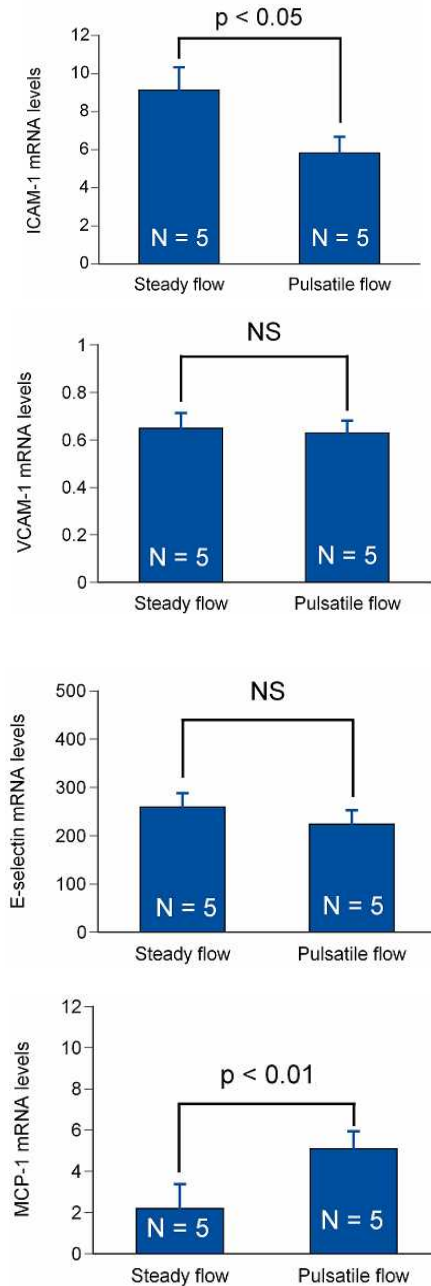


図4 拍動流負荷による細胞接着因子 ICAM-1、VCAM-1、E-selectin および走化性因子 MCP-1 の mRNA 発現量の変化(定常流負荷に対する比較)

しかし、高血糖(D-glucose 30mM)下では正常血糖(同5mM)に比べ、上記遺伝子の mRNA の発現が変化し、内皮細胞の分子生理

機能が変化して血栓形成性が亢進されることが認められた。高血糖 (D-glucose 30mM) 負荷において ICAM-1 の mRNA 発現が顕著に増加したが、高浸透圧 (D-glucose 5.5mM + L-glucose 24.5mM) 負荷では有意な変化がみられず、拍動流下における高血糖負荷が接着分子 ICAM-1 発現に直接的に関与することが示された (図 5)。拍動流下の VCAM-1 および E-selectin の mRNA 発現は高血糖状態で顕著に増加するが、高浸透圧負荷では僅かに増加する傾向がみられた。MCP-1 については高血糖および高浸透圧負荷で若干の増加を認めるに過ぎなかった。

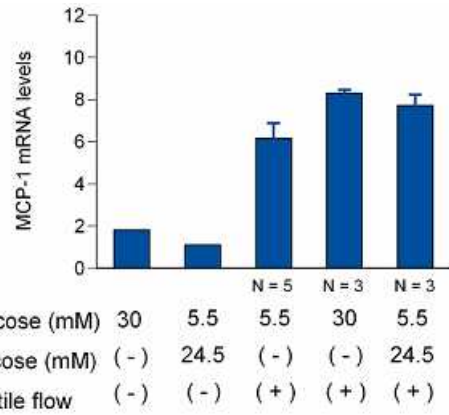
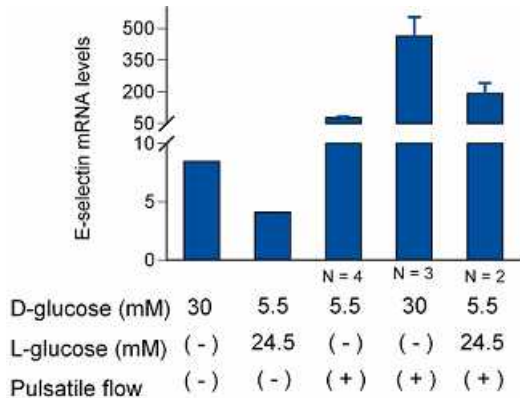
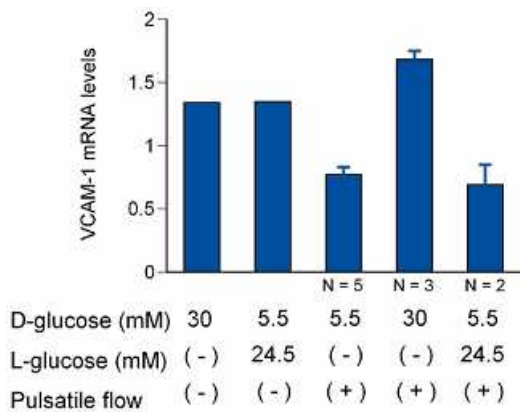
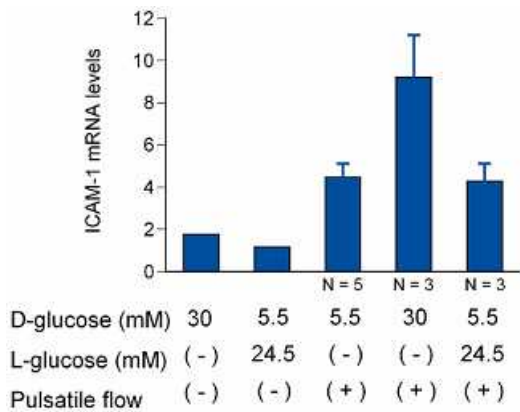


図 5 高血糖および高浸透圧負荷に対する拍動流の細胞接着因子 ICAM-1、VCAM-1、E-selectin および走化性因子 MCP-1 の mRNA 発現変化

一方、高血圧 (180 / 220mmHg) 状態では、正常血圧 (80 / 120mmHg) に比べ、これら mRNA レベルが顕著に増加し、管壁性圧力の増加が易血栓性と動脈硬化の亢進に関与することが示唆された。

虚血再灌流障害における血管内皮応答に関しては、1 時間虚血、4 時間後の再灌流 (H/R) において VCAM-1 および E-selectin の有意な発現亢進が確認され、ICAM-1 については若干の発現亢進が観測された。しかし、P-selectin についてはそれらとは逆に発現が抑制されるという結果が得られた (図 6)。

以上の結果と関連して糖尿病および虚血疾患における内皮細胞上の血小板および白血球の接着性と走化性を観測したところ、いずれの血球細胞も接着性・走化性が亢進しており、分子レベルの機能変化と細胞レベルの機能変化に高い相関性がみられた。

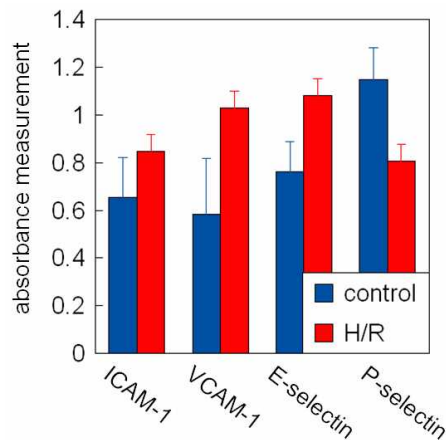


図 6 虚血・再灌流障害における血管内皮細胞上の各種接着因子の発現

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

南谷晴之，太田裕貴，中楯浩康，小俵麻里子，関塚永一，大塩力：光化学反応刺激による内皮細胞と血小板および白血球接着に対するイブジラストの作用の検討，日本血栓止血学会誌，19 巻 1 号，129 - 139，2008 年（査読あり）

H.Nakadate，Y.Hirose，E.Sekizuka，H.Minamitani：A new *in vitro* pulsatile perfusion system that mimics physiological transmural pressure and shear stress in any size of *in vivo* vessel，*Journal of Biomechanical Science and Engineering*，3 巻 1 号，25 - 37，129 - 139，2008 年（査読あり）

H.Nakadate，T.Shimizu，T.Uchida，E.Sekizuka，H.Minamitani：Platelet-endothelium interaction and thrombus formation in diabetic microcirculation，*Microvascular Reviews and Communications*，2 巻 1 号，24-32，2008 年（査読あり）

[学会発表](計 5 件)

太田裕貴，松村実美子，三木則尚，南谷晴之：光化学反応由来活性酸素による血管透過性障害のイメージング解析，第 17 回日本バイオイメージング学会学術集会，千葉大学 2008 年 10 月 31 日

南谷晴之，佐々木信彦，村上頼央：からだの中の反応を計測するバイオイメージング，第 17 回日本バイオイメージング学会学術集会，千葉大学 2008 年 10 月 30 日

H.Nakadate，E.Sekizuka，R.Hokari，S.Miura，H.Minamitani：Effects of

transmural pressure and shear stress on expressions of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in cultured human aortic endothelial cell，第 33 回日本微小循環学会総会，慶應義塾大学 2008 年 2 月 21 日  
K.Tsukada，N.Goda，H.Minamitani，D.Fukumura，M.Suematsu：Analytical approach and methods for tissue hypoxia: From the perspective of Physiome，第 33 回日本微小循環学会総会，慶應義塾大学 2008 年 2 月 22 日

R.Murakami，N.Sasaki，A.Ushiyama，H.Minamitani：A study on hemodynamics and oxygen diffusion in the early stage of tumor angiogenesis，第 33 回日本微小循環学会総会，慶應義塾大学 2008 年 2 月 21 日

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称：マイクロ流体デバイス及びそれを用いた分析装置

発明者：平原修三、南谷晴之

権利者：有限会社 フルイド

種類：特願

番号：2007-324005

出願年月日：2007 年 12 月 21 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

南谷 晴之(MINAMITANI HARUYUKI)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：70051779

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし